



**Набор ИФА**  
**для количественного определения**  
**Anti-H.Pylori специфических антител класса**  
**IgG, IgA или IgM типа в человеческой**  
**сыворотке или плазме**

**Кат. №** : EIA-4101  
**Количество** : 96  
**Производитель** : DRG (США)

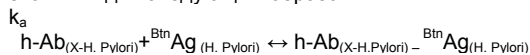
**Внимание:** основой при проведении анализа является оригинал инструкции на англ. языке.

Методика от 05-11-2009

**Принцип**

**Последовательный ELISA метод:**

Для последовательного ELISA анализа необходимыми реагентами являются иммобилизованный антиген, циркулирующее аутоантитело и ферментосвязуемое видоспецифическое антитело. В этой процедуре иммобилизация происходит на поверхности лунок во время взаимодействия стрептавидина, которым покрыта лунка, и экзогенного внесенного биотинилированного H.Pylori антитела. Во время смешивания биотинилированного антитела и сыворотки с антителом, происходит реакция между антигеном и антителом, в результате которой образуется иммунный комплекс. Иллюстрировано это выглядит следующим образом:

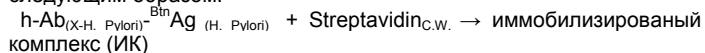


$B^{tn}Ag_{(H. Pylori)}$  = Биотинилированный Антиген (Постоянное Количество)  
 $h-Ab_{(X-H. Pylori)}$  = Человеческое Аутоантитело (Переменное Количество)

$Ab_{(X-H. Pylori)} - B^{tn}Ag_{(H. Pylori)}$  = Иммунный Комплекс (Переменное Количество)

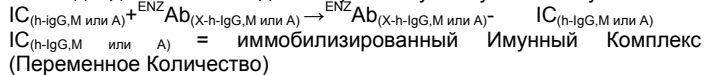
$K_a$  = Константа Ассоциации  
 $K_a$  = Константа Диссоциации

Одновременно комплекс осаждается на лунке стрептавидином и биотинилированным антигеном. Это взаимодействие изображено следующим образом:



Streptavidin<sub>C.W.</sub> = Стрептавидин, иммобилизованный на лунке Immobilized complex: сэндвич комплекс, связанный с твердой поверхностью.

После инкубационного периода лунка промывается для ее отделения от несвязавшихся антигенов декантацией или аспирацией. Ферментосвязуемое видоспецифическое антитело (anti-h-IgG, M или A) последовательно добавляется к микролунам. Это подводит связи к создавшемуся иммунному комплексу.



${}^{ENZ}Ab_{(X-h-IgG, M \text{ или } A)}$  = фермент-антитело Соединение (Стабильное Количество)

${}^{ENZ}Ab_{(X-h-IgG, M \text{ или } A)} \rightarrow {}^{IC}Ab_{(h-IgG, M \text{ или } A)} = Ag-Ab$  Комплекс (Переменный)  
 Anti-h-IgG, IgM или IgA ферментное соединение, связанное с иммунным комплексом, во второй инкубации отделяется от неступившего в реакцию материала промывкой. Ферментная активность в этой фракции прямо пропорциональна к концентрации антитела в образце. Путем анализа нескольких образцов сывороток при известной активности антител, можно вывести кривую, из которой определяется неизвестная активность антител.

**Реагенты**

**Материалы, поставляемые с набором:**

- A. **Anti-H. Pylori Калибраторы – 1мл/флакон**  
 Пять (5) флаконов с референс-растворами Anti-H. Pylori на уровне **0 (A); 10 (B); 25 (C); 50 (D); 100 (E)** мл IgG, IgM или IgA типа. Консервант добавлен. Хранить при 2 – 8°C.
- B. **Anti-H. Pylori Биотин конъюгат – 13 мл/флакон.**  
 Один (1) флакон, биотинилированных неактивированных H. Pylori в буферном матриксе. Консервант добавлен. Хранить при 2 – 8°C.

- C. **Фермент-антигенный конъюгат, 13 мл/флакон.**  
 Один (1) флакон, человеческих антител IgG, IgM или IgA культуры хреновой пероксидазы соединение в буферном матриксе. Консервант добавлен. Хранить при 2 – 8°C.
- D. **Микропланшет покрытый стрептави- дином – 96 лунок**  
 Один (1) 96-луночный микропланшет, покрытых стрептавидином и упакованных в алюминиевый пакетик с поглотителем влаги. Хранить при 2 – 8°C.
- E. **Концентрат-растворитель сыворотки – 20 мл.**  
 Один (1) флакон растворителя сыворотки с соевым буфером и красителем. Хранить при 2 – 8°C.
- F. **Концентрат для промывки – 20 мл.** Один (1) флакон с поверхностно-активным веществом (ПАВ) в соевом буфере. Консервант добавлен. Хранить при 2 – 30°C.
- G. **Субстрат А – 7 мл/флакон.** Одна (1) бутылочка с тетраметилбензидином в буфере. Хранить при 2 – 8°C.
- H. **Субстрат В – 7 мл/флакон.** Одна (1) бутылочка с перекисем водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в буфере. Хранить при 2 – 8°C.
- I. **Стоп Раствор – 8 мл/флакон.** Одна (1) бутылочка с концентрированной кислотой (1N HCl). Хранить при 2 – 30°C.
- J. **Инструкция по применению продукта**

**Примечание 1:** Не использовать реагенты по истечении срока годности.

**Примечание 2:** Открытые реагенты стабильны в течение 60 дней при температуре хранения 2 – 8°C.

**Примечание 3:** Реагенты предназначены для использования в микропланшете на 96 лунок.

**Материалы, необходимые, но НЕ поставляемые в наборе**

1. Пипетки на 50 и 10 мл с точностью лучше 1,5%.
2. Диспензеры на 0,100 и 0,300 мл с точностью лучше 1,5%.
3. Вошер или гибкая бутылка (не обязателен).
4. Считыватель на 450 и 620 нм.
5. Промокательная бумага для промокания лунок микропланшета.
6. Пластиковая обертка или покрытие для микропланшета для шагов инкубации.
7. Вакуумный аспиратор (не обязателен) для шагов инкубации.
8. Таймер.
9. Материалы контроля качества.

**Меры предосторожности**

**Для использования в диагностике ин-витро.**

**Не для наружного или внутреннего использования людьми и животными.**

Все компоненты набора, содержащие человеческий биоматериал, прошли испытания и признаны безопасными в отношении Гепатита В, С, поверхностного антигена ВИЧ 1 и 2. Тем не менее, к ним стоит относиться как к потенциально заразным и быть предельно осторожными при работе с этими реагентами.

**Отбор и подготовка образцов**

Образцы – это кровь, сыворотка или плазма крови; при их отборе через вену должны строго соблюдаться все правила данного метода. Для достижения более точных и четких результатов кровь необходимо отобрать натощак с утра. Дайте крови свернуться. Отцентрифугируйте её для получения сыворотки. Образцы могут быть заморожены при 2 – 8°C максимум на 5 дней. Если образцы не могут быть рассмотрены в течение данного периода времени, их следует заморозить до – 20°C на срок до 30 дней. Избегайте повторного замораживания и размораживания. Когда анализ двоянный, берется 0,100 мл образца (IgM и IgA) или 0,050 мл (IgG).

**Подготовка реагентов**

1. **Разбавитель сыворотки**  
 Развести концентрат сыворотки до 200 мл дистиллированной или деионизированной водой в соответствующем сосуде. Хранить при 2 - 8°C.
2. **Промывочный раствор**  
 Развести промывочный концентрат до 1000 мл дистиллированной или деионизированной водой в соответствующем сосуде. Хранить при комнатной температуре 20 - 27°C до 60 суток.
3. **Рабочий Субстратный Раствор**  
 Перелить содержимое флакона «А» во флакон «В». Перемешать и хранить при 2 – 8°C. Использовать в течение 60 суток. Если планируется использование на более длительный срок, то изначально рассчитывается

необходимое количество субстратов «А» и «В» и смешивается.

**Примечание:** Не использовать рабочий раствор, если он выглядит синим.

#### Процедура анализа

Перед началом анализа привести все реагенты, референтные сыворотки и контроли к комнатной температуре (20 - 27°C).

1. Расположить лунки микропланшета для каждой референтной сыворотки, контроля или разбавленного образца пациента для исследования в двойном экземпляре. **Поместить неиспользуемые стрипы обратно в алюминиевый пакет. Герметично закрыть и хранить запечатанным при 2 – 8°C.**
2. Раскапать по 0,025 мл соответственной референс-сыворотки, контроля и разбавленного образца пациента для определения IgG. Для определения IgM или IgA раскапать по 0,050 мл референс-сыворотки, контроля и образца в соответствующие лунки.
3. Добавить по 0,100 мл раствора биотинилированного конъюгата H.Pylori.
4. Покрутить планшет аккуратно в течение 20 – 30 секунд для смешивания и накрыть.
5. Инкубировать 60 минут при комнатной температуре.
6. Удалить содержимое микропланшета декантацией или аспирацией. При декантации протереть планшет насухо промокающей бумагой.
7. Добавить по 300 мл промывочного буфера (см. Подготовка Реагента) и снова подвергнуть декантации или аспирации. Повторить вышеупомянутую процедуру 2 раза (в сумме 3 промывки). Для этих целей может использоваться автоматический вошер. При использовании гибкой бутылки, заполните каждую лунку под давлением (не допуская возникновения пупырышек) для проведения промывки. Декантировать и повторить дополнительно два (2) раза.
8. Добавить по 0,100 мл ферментного anti-h-IgG, IgM или IgA раствора конъюгата во все лунки. **Всегда добавлять реагенты в одинаковой последовательности для минимизирования времени реакции между лунками. Не встряхивать планшет после добавления фермента.**
9. Накрыть и инкубировать 30 минут при комнатной температуре.
10. Повторить последовательность (см. п. 6 и 7) как указано выше.
11. Добавить по 0,100 мл раствора рабочего субстрата во все лунки. **Всегда добавлять реагенты в одинаковой последовательности для минимизирования времени реакции между лунками. Не встряхивать планшет после добавления фермента.**
12. Инкубировать при комнатной температуре в течение 15 минут.
13. Добавить по 0,050 мл стоп-раствора в каждую лунку и аккуратно перемешать 15-20 секунд. Всегда добавлять реагенты в одинаковой последовательности для минимизирования времени реакции между лунками.
14. Читать поглощение в каждой лунке при 450 нм. Результаты должны быть получены в течение 30 минут с момента добавления стоп-раствора.

**Примечание:** При проведении анализа образцов с концентрацией больше чем 100 Е/мл, растворите образец в пропорции 1:5 или 1:10 используя первичный растворяемый материал в сыворотке. Умножьте соответственно к пропорции для получения концентрации образца.

#### Контроль качества

Каждая лаборатория должна использовать во время анализа контроли низкого, нормального и высокого уровня для отслеживания качества процедуры. Эти контроли должны использоваться как неизвестные и значения должны получаться свои для каждого анализа. Значения контролей качества должны быть получены вместе с реагентами набора. Для уверенности должны использоваться соответствующие статистические методы. Каждая лаборатория должна иметь свои специфические условия проведения анализа. Значительное отклонение от полученных данных говорит о незаметных изменениях в экспериментальных условиях или разложении компонентов набора. Свежие реагенты используются для определения необходимости для вариаций.

#### Расчет результатов

Для исследования концентрации Anti-H.Pylori в неизвестном образце строится кривая.

1. Запишите поглощение, полученное в результате анализа на считыватель.

2. Нанесите точки на миллиметровой бумаге на графике поглощения дубликата референс-сыворотки в сравнении с активностью Anti-H.Pylori для каждого стандарта и для исследуемого образца (не выводить среднее число дубликата референс-сыворотки перед нанесением данных).
3. Нарисуйте наиболее подходящую кривую по этим точкам.
4. Для определения уровня неизвестной активности Anti-H.Pylori изобразите среднее значение неизвестного поглощения дубликата на вертикальной оси граф; найдите точку пересечения на кривой и прочтите концентрацию (в мл) с горизонтальной оси граф (среднее число неизвестных дубликатов можно выводить по изображенному). В последующем примере среднее поглощение составляет 1,603 (количество пересечений в кривой) при концентрации Anti-H.Pylori 64,0 мл.

#### Пример 1. (Типичные результаты для IgG, M или A)

Идентиф-я образца	Лунка №	Поглощ. (A)	Средняя Поглощ. (B)	Кол-во
Cal A	A1	0.042	0.044	0
	B1	0.046		
Cal B	C1	0.424	0.406	10
	D1	0.388		
Cal C	E1	0.810	0.791	25
	F1	0.772		
Cal D	G1	1.351	1.312	50
	H1	1.273		
Cal E	A2	2.377	2.328	100
	B2	2.279		
Пациент	C2	0.163	0.172	5.2
	D2	0.182		
Пациент	A3	1.534	1.603	64.0
	B3	1.671		

#### Параметры Контроля Качества

Максимальное поглощение (100 Е/мл калибратор) = > 1.3

#### Ограничения процедуры

##### А. Подготовка Анализа

1. Очень важно чтобы время реакции в каждой лунке было одинаковым при выведении результатов. Пипетирование образцов не должно превышать 10 минут. При использовании больше чем 1 планшета рекомендуется вывести повторно кривую дозы.
2. Добавление субстратного раствора ведет к кинетической реакции, которая останавливается добавлением предотвращающего раствора. Поэтому, добавление субстрата и предотвращающего раствора должно осуществляться в одинаковой последовательности для предотвращения отклонений во время реакции.
3. Планшеточные считыватели проводят измерения вертикально. Не касайтесь дна лунок.
4. Неправильное извлечение раствора во время промывочных шагов аспирации или декантации может привести к плохому отображению результатов и их неадекватности.
5. Очень высокая концентрация Anti-H.Pylori в образцах пациента может незамедлительно загрязнить другие образцы. Плохие дубликаты являются результатом непосредственного загрязнения. При любой повторной проверке любого человеческого образца, происходит поглощению в 3,0 единицы.
6. Образцы, подверженные микробиологическому загрязнению не должны использоваться.

##### Б. Интерпретация

При использовании компьютера для интерпретации данных анализа, необходимо учитывать, что ожидаемые показатели калибратора являются ниже 10% определенной концентрации.

Клиническое определение результата должно осуществляться совместно с определением наличия желудочно-кишечной болезни. Однако, клинические выводы должны не только основываться на данном анализе, но как дополнение к клиническим обследованиям пациента или к другим анализам из области гистологии, уреазы, деятельности бактерий. Положительный результат не указывает на наличие желудочно-кишечной болезни и не дифференцирует между колонизацией и инфекцией H.Pylori. Соответственно, отрицательный результат не демонстрирует отсутствие инфекции H.Pylori, скорее всего очень низкую плотность антитела, что можно отнести к ранним стадиям колонизации.

**Ожидаемые диапазоны значений**

**Наличие IgG и IgA антител к H.Pylori считается подтвержденным когда уровень сыворотки превышает 40 Е/мл.**

**Наличие IgM антител к H.Pylori считается подтвержденным когда уровень сыворотки превышает 40 Е/мл.**

**Характеристики проведения анализа****А. Точность Anti-H. Pylori - IgG**

Точность анализа и ряда анализов *Anti-H. Pylori - IgG* Микропланшеточной EIA Системы Анализа определена с помощью двух разноуровневых контрольных сывороток. Количество, среднее число, стандартное отклонение ( $\sigma$ ) и коэффициент вариации для каждой из этих контрольных сывороток отображено в Табл. 2 и 3.

Табл. 2

**Точность внутреннего анализа (измер. в мл)**

Образец	N	X	$\sigma$	KB
Отрицательный	20	5,5	0,31	5,6%
Положительный	20	43,2	1,85	4,3%

Табл. 3\*

**Точность межтестового анализа (измер. в мл)**

Образец	N	X	$\sigma$	KB
Отрицательный	10	5,8	0,40	6,9%
Положительный	10	42,1	2,10	5,0%

\* Определено 10 экспериментами при дубликации.

**В. Точность Anti-H. Pylori – IgM**

Точность анализа и ряда анализов *Anti-H. Pylori - IgM* Микропланшеточной EIA Системы Анализа определена с помощью двух разноуровневых контрольных сывороток. Количество, среднее число, стандартное отклонение ( $\sigma$ ) и коэффициент вариации для каждой из этих контрольных сывороток отображено в Табл. 2 и 3.

Табл. 4

**Точность Внутреннего Анализа (измер. в мл)**

Образец	К-во	X	$\sigma$	KB
Отрицательный	20	3,1	0,23	7,4%
Положительный	20	39,8	1,65	4,1%

Табл. 5\*

**Точность Межтестового Анализа (измер. в мл)**

Образец	К-во	X	$\sigma$	KB
Отрицательный	10	3,8	0,34	8,9%
Положительный	10	37,1	2,80	7,5%

\* Определено 10 экспериментами при дубликации.

**С. Точность Anti-H. Pylori – IgA**

Точность анализа и ряда анализов *Anti-H. Pylori - IgA* Микропланшеточной EIA Системы Анализа определена с помощью двух разноуровневых контрольных сывороток. Количество, среднее число, стандартное отклонение ( $\sigma$ ) и коэффициент вариации для каждой из этих контрольных сывороток отображено в Табл. 2 и 3.

Табл. 6

**Точность Внутреннего Анализа (измер. в мл)**

Образец	К-во	X	$\sigma$	KB
Отрицательный	20	2,8	0,22	8,5%
Положительный	20	25,5	1,35	5,3%

Табл. 7\*

**Точность Межтестового Анализа (измер. в мл)**

Образец	К-во	X	$\sigma$	KB
Отрицательный	10	2,5	0,20	8,0%
Положительный	10	25,1	1,90	7,6%

\* Определено 10 экспериментами при дубликации.

**ЛИТЕРАТУРА**

(См. в оригинале инструкции).

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:**

**ЧМП «ДИАМЕБ»**  
 Ул. Чорновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005  
 Тел.: (0342) 775122  
 Тел/факс: (0342) 775612  
 E-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)